

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 1 月 10 日 (10.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/03069 A1

(51) 国際特許分類: G01N 33/566, 33/53, 33/58

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05631

(22) 国際出願日: 2001 年 6 月 29 日 (29.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-202730 2000 年 7 月 4 日 (04.07.2000) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本
町4丁目1番8号 Saitama (JP).宿区市ヶ谷薬王寺町45-1-203 Tokyo (JP). 佐藤守俊
(SATO, Moritoshi) [JP/JP]; 〒113-0023 東京都文京区
向丘2-25-16 向丘サニーコーポ103 Tokyo (JP). 小澤
岳昌 (OZAWA, Takeaki) [JP/JP]; 〒270-2231 千葉県松
戸市稔台617-18 Chiba (JP).(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒
150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階
Tokyo (JP).

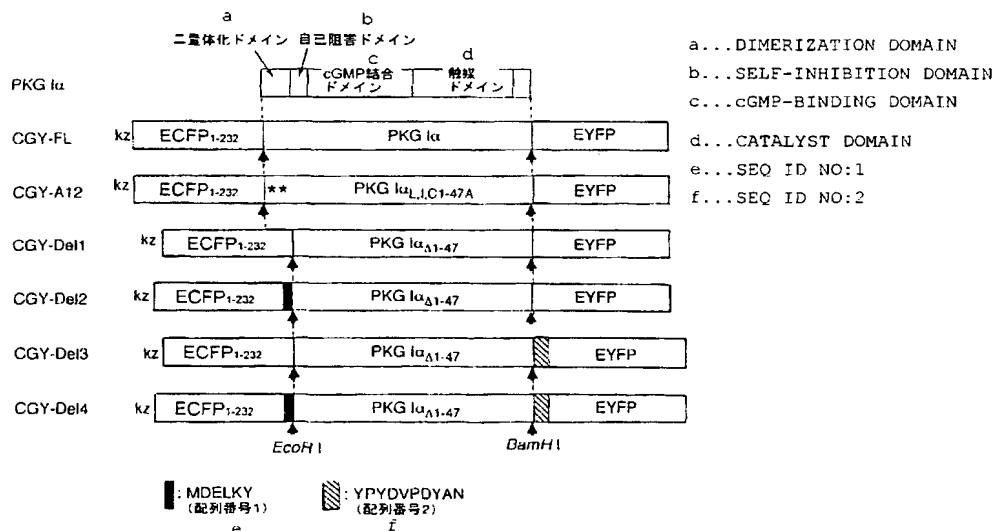
(81) 指定国 (国内): CA, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 梅澤喜夫
(UMEZAWA, Yoshio) [JP/JP]; 〒162-0063 東京都新2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。(54) Title: cGMP-VISUALIZING PROBE AND METHOD OF DETECTING AND QUANTIFYING cGMP BY USING THE
SAME

(54) 発明の名称: cGMP可視化プローブ及びそれを利用したcGMPの検出・定量方法



(57) Abstract: As a cGMP probe which makes it possible to highly accurately and conveniently detect and quantify cGMP in vivo, a cGMP-visualizing probe consisting of a polypeptide specifically binding to cGMP and two chromophores provided at both ends of the polypeptide and having different fluorescent wavelength from each other is provided.

[続葉有]



(57) 要約:

in vivo においても高い精度で、簡便に、c G M Pを検出・定量することを可能とするc G M Pプローブと、それを用いたc G M Pの検出・定量方法として、c G M Pに特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に異なる蛍光波長を有する2つの発色団からなるc G M P可視化プローブを提供する。

明 細 書

c G M P 可視化プローブ及びそれを利用した

c G M P の検出・定量方法

技術分野

この出願の発明は、c G M P を検出・定量するための可視化プローブと、それを用いた c G M P の検出・定量方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、c G M P に特異的に結合でき、c G M P と特異的に結合することによって光学的変化を生じ、c G M P の検出・定量を可能とする c G M P 可視化プローブと、それを用いた c G M P の検出・定量方法に関するものである。

背景技術

細胞内二次情報伝達である環状グアノシンーリン酸 (c G M P) は、生体内において、各種生化学反応過程のシグナル分子として作用している。これまでに、循環器系筋細胞の緩和、網膜における光伝達、上皮での電解質運搬、骨の成長、ニューロン活性等の様々な生理的プロセスが c G M P によって制御されていることが明らかになっている。したがって、生細胞中での c G M P の合成、分解、局在等が明らかになれば、細胞および組織レベルでの循環器系、腎臓、網膜、嗅覚、中枢神経等の作用機構が解明されるだけでなく、ホスホジエステラーゼ阻害剤のように、細胞内における c G M P 濃度を制御する物質に関する知見を得る足がかりになると期待される。

これまで、c G M P を検出・定量する方法としては、放射性同位体によって標識された化合物を用いる放射性免疫測定法 (ラジオイ

ムノアッセイ)が行われてきた。しかし、この方法は、細胞を破壊し、細胞可溶化物と標識化合物の結合を検出することにより、全 c G M P 量を分析するものであり、細胞生物学的、あるいは薬学的に要求される精度が実現されていなかった。

さらに、このようなラジオイムノアッセイは、破壊的測定法であるため、また同位体標識された物質は安定性が低く、取り扱いにも注意を要するため、c G M P の *in vitro* 測定にのみ適用できるという点で、測定の適用範囲に限界があったのが実情である。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、*in vivo* においても高い精度で、簡便に、c G M P を検出・定量することを可能とする c G M P 可視化プローブと、それを用いた c G M P の検出・定量方法を提供することを課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第 1 には、c G M P に特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に連結された異なる蛍光波長を有する 2 つの発色団からなることを特徴とする c G M P 可視化プローブを提供する。

第 2 には、この出願の発明は、上記プローブにおいて、c G M P に特異的に結合するポリペプチドが c G M P 結合蛋白であること、第 3 にはこのような c G M P 結合蛋白が c G M P 依存性キナーゼ I α であることを態様として提供する。

また、この出願の発明は、第 4 には、発色団がポリペプチドの N - 末端に連結されたシアン蛍光蛋白と、C - 末端に連結された黄色蛍光蛋白である c G M P 可視化プローブを提供する。

さらに、第5には、この出願の発明は、上記のいずれかのcGMP可視化プローブをcGMPと共存させ、蛍光波長の変化を測定することを特徴とするcGMPの検出および定量方法をも提供する。

第6には、この出願の発明は、前記のいずれかのcGMP可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、cGMP可視化プローブをcGMPと共存させるcGMPの検出および定量方法を、第7には、前記のいずれかのcGMP可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてcGMP可視化プローブとcGMPを共存させるcGMPの検出および定量方法を提供する。

また、この出願の発明は、第8には、上記のいずれかのcGMP可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物をも提供する。

そして、第9には、この出願の発明は、上記第8の発明の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞におけるcGMPを定量する物質のスクリーニング方法をも提供する。

図面の簡単な説明

図1は、この発明のcGMP可視化プローブの構成を例示した概略模式図である。

図2は、この発明の実施例において、cGMP可視化プローブを発現したCHO-K1細胞における8-Br-cGMP応答性を示した図である。(a)は、CGY-FL、CGY-A12、およびC

G Y - D e l 1 を発現した細胞の顕微鏡像である。(励起: $440 \pm 10 \text{ nm}$ 、フィルター: $480 \pm 15 \text{ nm}$ (C F P) および $535 \pm 12.5 \text{ nm}$ (Y F P))。(b) は、 1 mM の 8 - B r - c G M P と共存させた C G Y 発現 C H O - K 1 細胞の $480 \pm 15 \text{ nm}$ から $535 \pm 12.5 \text{ nm}$ への発光比の経時変化を示す。

図 3 は、この発明の実施例において、C G Y - F L、C G Y - D e l 1、C G Y - A 1 2 を発現した C H O - K 1 細胞を 8 - B r - c G M P で刺激した際の発光比の経時的変化を示すグラフである。(a) C G Y - F L、(b) C G Y - D e l 1、(c) C G Y - A 1 2 をそれぞれ示す。

図 4 は、この発明の実施例において、 $480 \pm 15 \text{ nm}$ (C F P) および $535 \pm 12.5 \text{ nm}$ (Y F P) における C G Y - D e l 1 発現 C H O - K 1 細胞の細胞質蛍光強度の速度論的挙動を示すグラフである。(a) C F P、(b) Y F P をそれぞれ示す。

図 5 は、この発明の実施例において、C G Y - F L、C G Y - A 1 2、C G Y - D e l 1、C G Y - D e l 2、C G Y - D e l 3、および C G Y - D e l 4 の初期発光比と発光比変化を示す図である。

図 6 は、この発明の実施例において、C G Y - D e l 1 を発現した H E K 2 9 3 細胞を $500 \mu \text{M}$ の N O C - 7 で刺激した際の細胞質の発光比を示す顕微鏡像である。(N O C - 7 添加 900 秒後、8 - B r - c G M P を添加。)

図 7 は、この発明の実施例において、C G Y - D e l 1 を発現した H E K 2 9 3 細胞を $500 \mu \text{M}$ の N O C - 7 で刺激した際の発光比の変化を示すグラフである。(a) C G Y - D e l 1 発現 H E K 2 9 3 細胞、(b) $100 \mu \text{M}$ のザプリナストで処理された C G Y - D e l 1 発現 H E K 2 9 3 細胞、(c) $10 \mu \text{M}$ の O D Q で処理された

C G Y - D e l 1 発現 H E K 2 9 3 細胞をそれぞれ示す。

図 8 は、この発明の実施例において、C G Y - D e l 1 を発現した H E K 2 9 3 細胞を $500\mu\text{M}$ の N O C - 7 で刺激した際の発光比の変化を示すグラフである。(a)は、N O C - 7 添加 9 0 0 秒後、8 - B r - c G M P 添加したもの、(b)は、N O C - 7 添加 9 0 0 秒後、ザプリナスト添加したものである。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明の c G M P 可視化プローブは、各々異なる機能を有する 2 つの部位からなるものである。つまり、この c G M P 可視化プローブは、選択的に c G M P を認識する c G M P 特異結合部位と、c G M P と c G M P 特異結合部位の c G M P 認識により光学的に信号発信する発色部位からなるものである。

この出願の発明の c G M P 可視化プローブは、c G M P と共存したとき、c G M P 特異結合部位が c G M P と結合し、その際に生じる発色部位の立体配置の変化が、光学的変化として現れるという原理により作用するものであり、この光学的変化を測定することにより、c G M P を検出・定量できるものである。

c G M P と特異的に結合する部位は、例えば、種々の c G M P 結合蛋白等のポリペプチドである。c G M P 結合蛋白としては、c G M P 依存性蛋白キナーゼ 1α (P K G 1α) が例示される。

哺乳動物の P K G 1α は、図 1 に示される 4 種の機能性ドメイン (二量体化ドメイン、自己阻害ドメイン、c G M P 結合ドメイン、触媒ドメイン) を有するふたつの同一モノマーからなる。N - 末端側に存在する二量体化ドメインは、ロイシン / イソロイシンジッパ

一モチーフからなる。c G M P が共存しない場合、P K G 1 α は、キナーゼ不活性で、触媒中心が自己阻害ドメインによって占有されるクローズドコンホメーションを示す。一方、c G M P と結合したP K G 1 α では、自己阻害ドメインが活性中心から除去され、P K G 1 α は、オープンコンホメーションを示す。したがって、このようなP K G 1 α の両末端に発色団を連結させれば、c G M P との結合により光学的変化が生じ、c G M P との結合を可視的に検出できるのである。

もちろん、c G M P と特異的に結合するポリペプチドは、P K G 1 α や、c G M P 結合蛋白に限定されず、合成および天然のあらゆるペプチド鎖を用いることができる。

この出願の発明のc G M P 可視化プローブにおいて、分子認識の結果を光学的変化として発信する部位としては、種々の発色団が考慮される。このとき、発色団は、c G M P とc G M P 結合部位の結合により生じる立体構造の変化に応答して精度高く波長変化を生じる必要がある。生化学の分野においては、一般的に種々の蛍光発色団が用いられるが、立体構造の変化に敏速に応答するものとしては、蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) の生起により色調に変化を来たす発色団がある。

したがって、この出願の発明のc G M P 可視化プローブにおいては、分子認識の結果を光学的変化として発信する部位として、異なる蛍光波長を有する2つの蛍光発色団を、各々c G M P と特異的に結合するポリペプチドの両末端にそれぞれ連結する。このような蛍光発色団としては、緑色蛍光蛋白 (G F P) のブルーシフト変異蛋白であるシアン蛍光蛋白 (C F P) や、G F P のレッドシフト変異蛋白である黄色蛍光蛋白 (Y F P) が好ましく選択される。このと

き、CFPをcGMPと特異的に結合するポリペプチドのN-末端に、YFPをC-末端に連結することにより、それぞれドナーおよびアクセプターとして作用し、FRETが生起される。

すなわち、この出願の発明のcGMP可視化プローブは、cGMPとの共存下において、cGMP結合蛋白部位とcGMPが結合し、N-およびC-末端のそれぞれの蛍光発色団によるFRETが生起して、蛍光波長の変化を生じるものである。そして、このような蛍光変化を通常行われる種々の化学的および／または生化学的分析方法を用いて測定することにより、cGMPを検出することが可能となるのである。また、蛍光強度とcGMP濃度の関係を予め検量することにより、試料溶液中のcGMP濃度を定量することもできるのである。

この出願の発明では、以上のとおりのcGMP可視化プローブとcGMPを共存させる方法として、様々な方法が考えられる。例えば、細胞を破壊して、細胞内からcGMPを溶出させ、その溶液にcGMP可視化プローブを添加して、cGMPとcGMP可視化プローブを共存させる方法があげられる。このような方法でcGMPとcGMP可視化プローブを共存させる場合には、cGMPを *in vitro* で検出・定量できる。

また、この出願の発明では、cGMP可視化プローブを組み込んだ発現ベクターを個々の培養細胞に導入する方法により、cGMPとcGMP可視化プローブを共存させることができる。発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このよ

うに、c G M P可視化プローブを組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法を用いることにより、細胞内でc G M Pとc G M P可視化プローブが共存でき、細胞を破壊することなく、c G M Pの検出および定量をする *in vivo* 法が可能となる。

さらに、この出願の発明のc G M Pの検出および測定方法では、c G M P可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてc G M P可視化プローブとc G M Pを共存させることもできる。

この出願の発明では、以上のとおりの各種方法により、c G M P可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、全細胞においてc G M P可視化プローブとc G M Pが共存しているトランスジェニック非ヒト動物が得られる。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法（例えば *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77; 7380-7384, 1980）に従って作成することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞にc G M P可視化プローブを保有しているため、例えば、その体内に医薬品や毒物などの検査物質を導入し、細胞および組織におけるc G M Pの濃度を測定することによって、様々な物質のスクリーニングを行うことができる。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

この出願の発明のc G M P可視化プローブは、遺伝子的にコードされているため、通常の遺伝子工学的手法を用いて、最適化するこ

とができる。例えば、細胞内における c G M P 可視化プローブの位置などは、シグナル配列やグアニリルシクラーゼ等の蛋白質、環状ヌクレオチド作動性カチオンチャンネル、P K G 1α のアンカリング蛋白質等を融合することにより制御することができる。

さらに、この出願の発明の c G M P 可視化プローブと同様に、環状ヌクレオチドの結合ドメインに関する遺伝子工学的知見に基づいて、環状アデノシンーリン酸 (c A M P) 可視化プローブ等を発展させることも考えられる。

実施例

<実施例 1> c G M P 可視化プローブの作成

発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白 (E G F P : 例えば Current Biology 6 (2) ; 178-182, 1996) の変異蛋白である、シアン蛍光蛋白 (E C F P : F64L/S65T/Y66W/N146I/M153T/V163A/N212K) と黄色蛍光蛋白 (E Y F P : S65G/V68L/Q69K/S72A/T203Y) を、図 1 に示されるように c G M P 依存性蛋白キナーゼ (P K G 1α) の N-および C-末端にそれぞれ遺伝子工学的に連結し、C F P - P K G 1α - Y F P 融合蛋白 (以下 C G Y とする) を作成した。

また、この C G Y において、P K G 1α のアミノ酸配列を全長有するもの (以下 C G Y - F L とする) の他に、同様の方法により、P K G 1α の 1 ~ 47 番目のアミノ酸のうち、ロイシン、イソロイシン、およびシステイン残基をすべてアラニンに変換したもの (以下 C G Y - A 1 2 とする)、P K G 1α の 1 ~ 47 番目のアミノ酸を削除し、P K G 1α ($\Delta 1-47$) としたもの (以下 C G Y - D e l 1 とする) を作成した。

さらに、CGY-De11において、PKG1 α (Δ 1-47)とECFPの間に配列番号1のリンカー配列(MDE LKY)を導入したもの(以下CGY-De12とする)、PKG1 α (Δ 1-47)とEYFPの間に配列番号2のリンカー配列(YPYDV P DYAN)を導入したもの(以下CGY-De13とする)、およびPKG1 α (Δ 1-47)とECFPの間に前記配列番号1のリンカー配列(MDE LKY)、PKG1 α (Δ 1-47)とEYFPの間に前記配列番号2のリンカー配列(YPYDV P DYAN)を導入したもの(以下CGY-De14とする)を同様に作成した。

<実施例2> チャイニーズハムスター卵巢細胞へのcGMP可視化プローブ(CGY)の導入

チャイニーズハムスターの卵巢細胞(CHO-K1)を10%ウシ胎児血清(FCS)を補充したHamのF-12培養液中、37℃、5%CO₂下で培養した。

得られたCHO-K1に、LipofectAMINE2000試薬(ライフテクノロジー社製)を用いて、CGY-FL、CGY-De11、CGY-A12発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入した。

さらに、遺伝子導入後12~24時間後にこれらの各種CGY発現CHO-K1を取り出し、ガラス底培養皿に塗布した。

<実施例3> cGMP可視化プローブ(CGY)を導入されたCHO-K1のイメージング

まず、実施例2の培養液をHankの平衡塩類溶液で置換した。

次に、MetaFluor(Universal Imaging社製)で制御され、冷却されたCCDカメラ(MicroMAX: Roper Scientific社製)を有するCarl Zei

ss Axiovert 135 顕微鏡で、CGY 導入後 3～5 日経過した CHO-K1 を室温にてイメージングした。露光速度は $440 \pm 10 \text{ nm}$ 、励起は 50 ms で、顕微鏡像は、 $480 \pm 15 \text{ nm}$ フィルターおよび $535 \pm 12.5 \text{ nm}$ フィルターを通して、 $40\times$ の油浸レンズ (Carl Zeiss 社製) で検出された。

図 2 (a) に、遺伝子導入された細胞の CFP (480 nm) および YFP (535 nm) の顕微鏡像を示した。これより CGY-A12 が、細胞核内にまで導入されていることが示された。

CGY-De11 発現 CHO-K1 の中の約 30% が、CFP および YFP による細胞核での発光を示したことから、PKG1 α の二量体化ドメインにおいて、ロイシン/イソロイシンジッパーモチーフにキナーゼを細胞核外に留めるような情報が込められていると考えられる。

<実施例 4> cGMP 可視化プローブ (CGY) の応答性

実施例 1 で作成された各 CGY 発現 CHO-K1 を、cGMP の細胞膜透過性ホスホジエステラーゼ抵抗性類似体として知られる 8-Br-cGMP で刺激し、蛍光顕微鏡で蛍光を測定した。

(1) CGY-FL 発現 CHO-K1

図 2 (b) に、8-Br-cGMP 添加前および 8-Br-cGMP (1 mM) 添加後の、CGY 発現 CHO-K1 の発光比の変化 ($480 \pm 15 \text{ nm}$ から $535 \pm 12.5 \text{ nm}$) を示した。

また、図 3 に、細胞基質における発光比の経時的変化を示した。

これより、CGY-FL では、発光比に大きな変化が見られないことが明らかになった。また、CFP および YFP の蛍光強度は、8-Br-cGMP の添加により影響されないことが明らかになった。

(2) CGY-De11 発現 CHO-K1

一方、CGY-De11 発現 CHO-K1 では、図 2 b に示したとおり、8-Br-cGMP の添加によって発光比の顕著な減少が確認された。

また、図 4 に示したように、CFP および YFP 強度には、相反的变化が見られた。また、発光比の減少は、CFP および YFP 強度の相反的变化と経時的に同様な傾向にあることが分かった。

以上より、8-Br-cGMP が CGY-De11 と結合することにより、CFP および YFP 間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が増大していることが示された。

(3) CGY-A12 発現 CHO-K1

また、CGY-A12 発現 CHO-K1 では、8-Br-cGMP の添加によって発光に変化が見られた (図 2 b、3)。しかし、その最大発光比変化は、CGY-De11 におけるその約 1/3 程度と小さかった。

<実施例 5> cGMP 可視化プローブにおけるリンカー配列導入の影響

CHO-K1 細胞中に実施例 1 で作成された CGY-De11、CGY-De12、CGY-De13、および CGY-De14 を実施例 2 と同様の方法で発現し、発光強度の変化を測定した。

8-Br-cGMP と共存させた際の初期発光比と蛍光比の変化の関係を図 5 に示した。

これより、各 cGMP 発現 CHO-K1 で、8-Br-cGMP 添加に対する応答が確認されたが、配列番号 1 (MDELKY) および、配列番号 2 (YPYDVPDYAN) のいずれのリンカー配列も、初期発光比および蛍光比に対してあまり大きな効果を示さな

いことが明らかになった。

また、CGY-A12とCGY-DEL1～4の間で、初期発光比に大きな差が見られないことから、この発明のcGMP可視化プローブでは、ポリペプチド鎖中に種々の柔軟なドメインを導入することによって、その構造を最適化できることが示唆される。

以上の結果より、CGY-De11～4が、細胞中のcGMP濃度を測定するためのcGMP可視化プローブとして好ましいものであることが示された。

<実施例6> ヒト胎児腎細胞へのCGYの導入

ヒト胎児腎細胞(HEK293)を10%FCS、1mMピルビン酸ナトリウム、および0.1mMの非必須アミノ酸を補充したDulbeccoの改良Eagle培養液中、37℃、5%CO₂下で培養し、HEK293を得た。

得られたHEK293に、実施例2と同様の方法で、CGY-De11、CGY-De12、CGY-De13、CGY-De14の発現ベクターをそれぞれ遺伝子導入し、各CGY発現HEK293を得た。

<実施例7> cGMP可視化プローブを用いた生体細胞内におけるcGMPの定量

cGMP可視化プローブを用いて、生体細胞を一酸化窒素(NO)で刺激した際に発生する細胞内のcGMPを検出した。

まず、実施例6で得られたCGY-De11導入HEK293において、細胞内の可溶性グアニリルシクラーゼを活性化させるためにNOを自発的かつ速度論的に放出する化合物であるNOC-7を、最終的な細胞外濃度が500μMとなるように添加した。

図6にCGY-De11発現HEK293単一細胞におけるNO

C-7 誘発発光における顕微鏡像を示した。

図6から、CGY-Del1を発現したHEK293細胞に500 μ MのNOC-7を添加することにより発光比は急激に減少するが、その後再び発光比の増大が見られ、発光比はほぼ初期値まで戻ることが示された。

また、図7に、CGY-Del1発現HEK293単一細胞におけるNOC-7誘発発光比の変化を示した。

発光比は、まず急激に減少し、その後緩やかに増大した。

次に、CGY-Del1発現HEK293を100 μ Mのザプリナスト(cGMP特異的ホスホジエステラーゼの選択的阻害剤)で処理したところ、同様に初期の急激な発光比の減少が見られた。しかし、その後の緩やかな発光比の増大は見られなくなった。

また、細胞をあらかじめ10 μ MのODQ(NO-感受性グアニリルシクラーゼの選択的阻害剤)で処理した場合には、NOC-7による発光比変化は全く見られなくなった。

図7から、発光比が減少した後に再び発光比が増大する現象は、cGMP特異的ホスホジエステラーゼによるcGMP分解によるものと示唆される。

同様の結果は、CGY-DE12~4を発現したHEK293単一細胞についても得られた。

以上より、この出願の発明のcGMP可視化プローブを用いて、生体細胞内におけるcGMPの発生が確認できることが示された。

<実施例8> cGMP可視化プローブによる細胞内cGMP変動の測定

そこで、上記の系にcGMPのホスホジエステラーゼ抵抗性類似体である8-Br-cGMPを1mM添加した。

図 8 に結果を示した。

発光比は、減少、増加の後、8-Br-cGMPを1mM添加することにより、再び減少した。また、8-Br-cGMPの代わりにザプリナストを用いても、同様に、発光比が回復した系での再減少が確認された。

以上の結果より、CGY-De11のcGMP検出による応答が可逆的であり、この出願の発明のcGMP可視化プローブを用いることにより生体細胞におけるcGMP濃度の変動を測定することが可能となることが確認された。

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、in vivoにおいても高い精度で、簡便に、cGMPを検出・定量することを可能とするcGMPプローブと、それを用いたcGMPの検出・定量方法が提供される。

請求の範囲

1. c G M P に特異的に結合するポリペプチドと、該ポリペプチドの両末端に連結された、異なる蛍光波長を有する2つの発色団からなることを特徴とするc G M P 可視化プローブ。
2. c G M P に特異的に結合するポリペプチドがc G M P 結合蛋白である請求項1のc G M P 可視化プローブ。
3. c G M P 結合蛋白がc G M P 依存性キナーゼ I α である請求項2のc G M P 可視化プローブ。
4. 発色団がポリペプチドのN-末端に連結されたシアン蛍光蛋白と、C-末端に連結された黄色蛍光蛋白である請求項1ないし3のいずれかのc G M P 可視化プローブ。
5. 請求項1ないし4のいずれかのc G M P 可視化プローブをc G M P と共存させ、蛍光波長の変化を測定することを特徴とするc G M P の検出および定量方法。
6. 請求項1ないし4のいずれかのc G M P 可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、c G M P 可視化プローブをc G M P と共存させる請求項5のc G M P の検出および定量方法。
7. 請求項1ないし4のいずれかのc G M P 可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてc G M P 可視化プローブとc G M P を共存させる請求項5の検出および定量方法。
8. 請求項1ないし4のいずれかのc G M P 可視化プローブを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性

細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。

9. 請求項 8 の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における c G M P を定量する物質のスクリーニング方法。



図 1

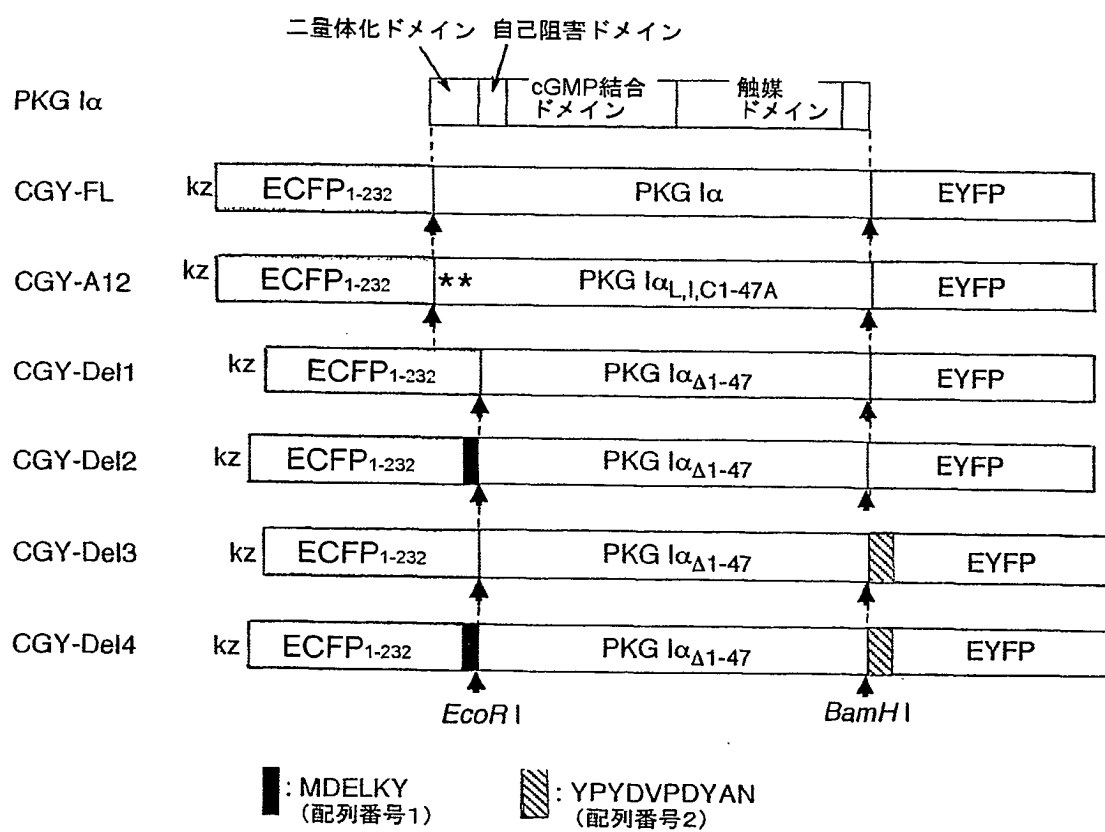
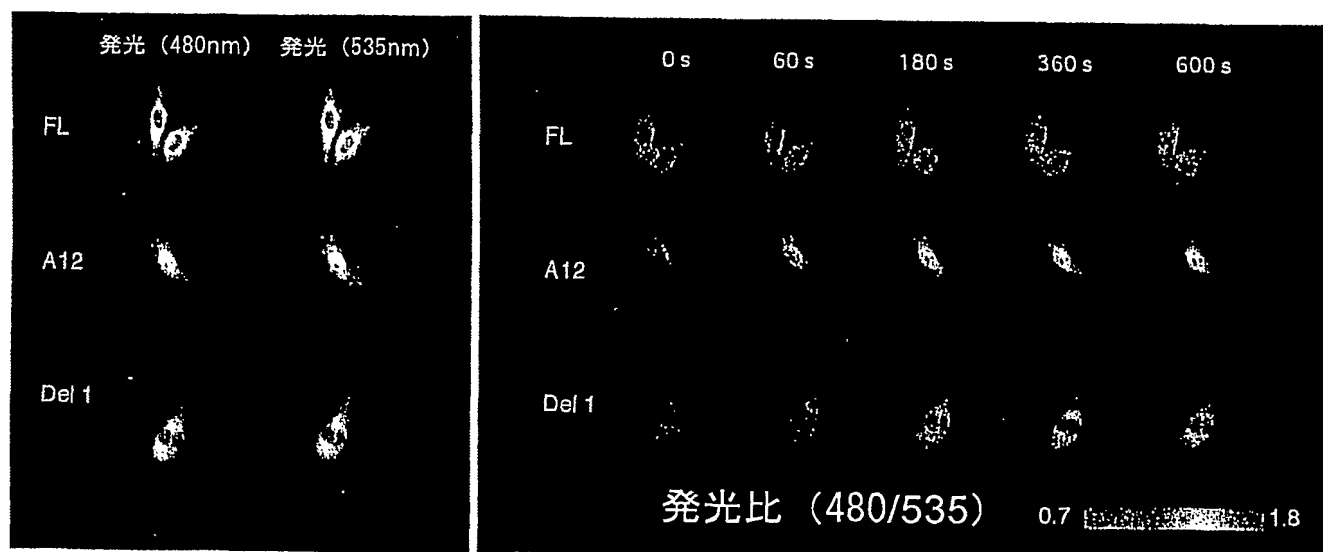


図 2

(a)

(b)



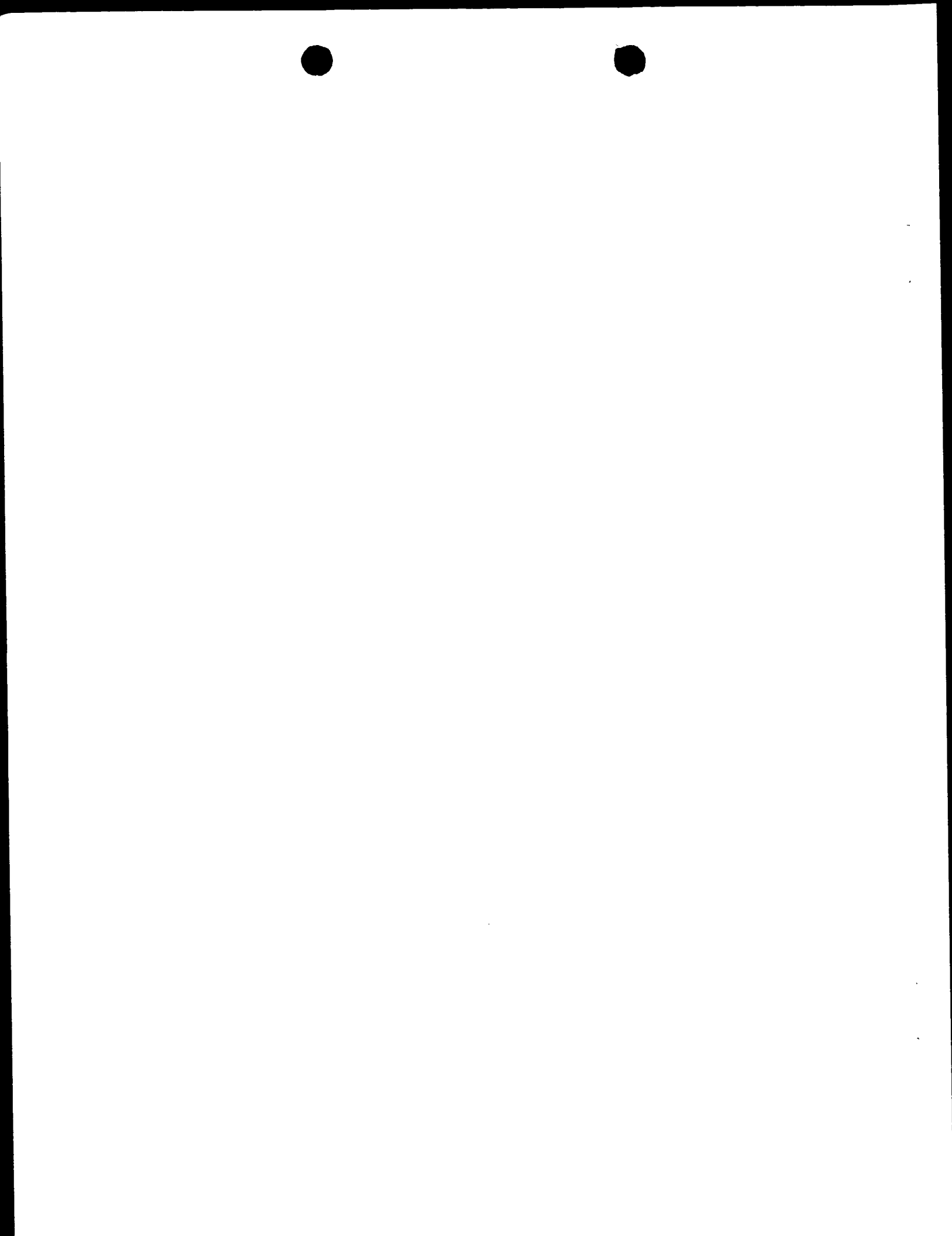


図 3

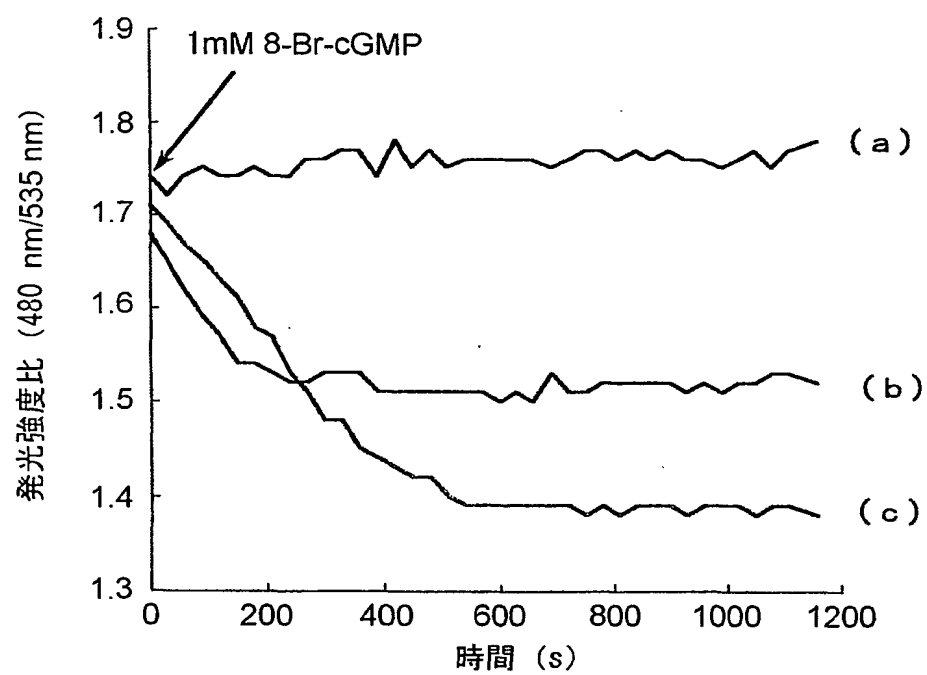




図 4

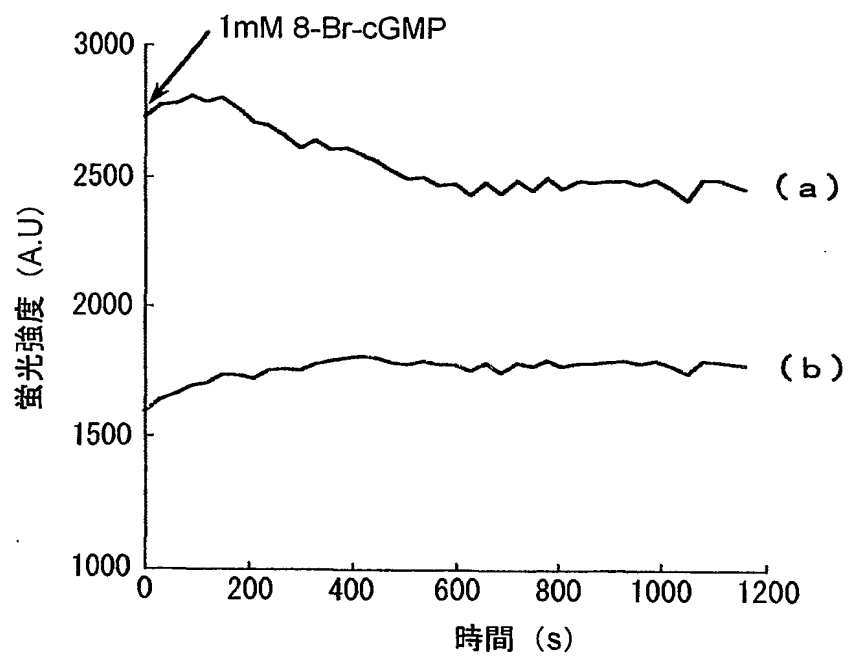




図 5

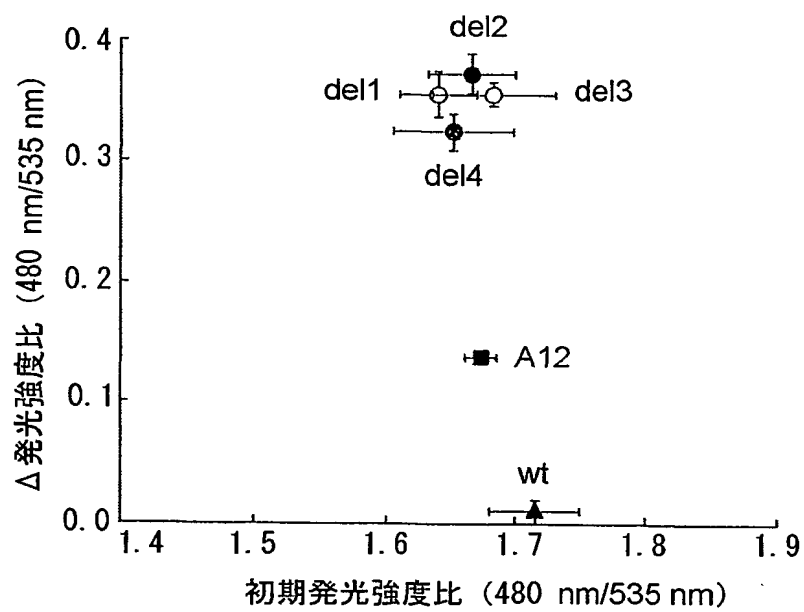




図 6

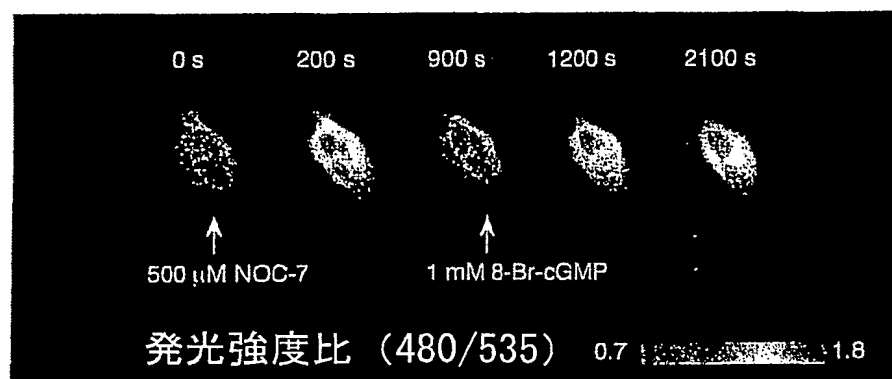




図 7

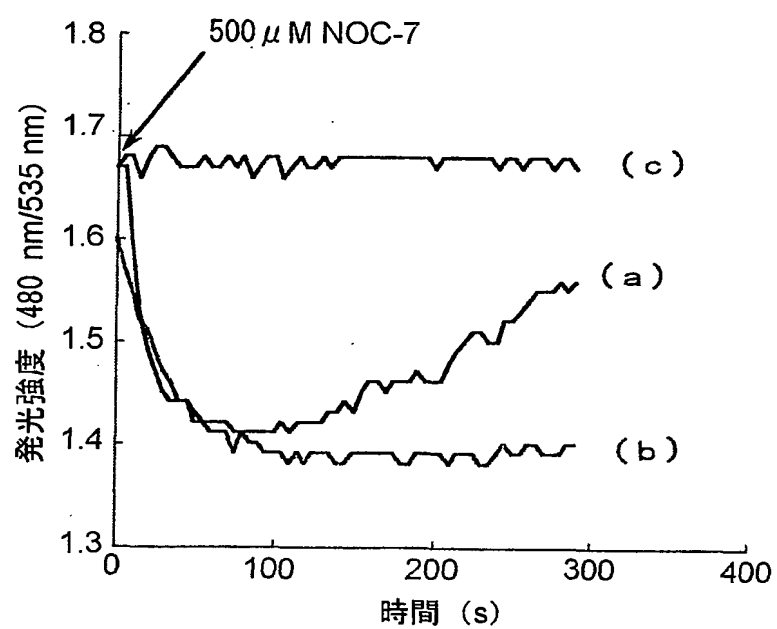
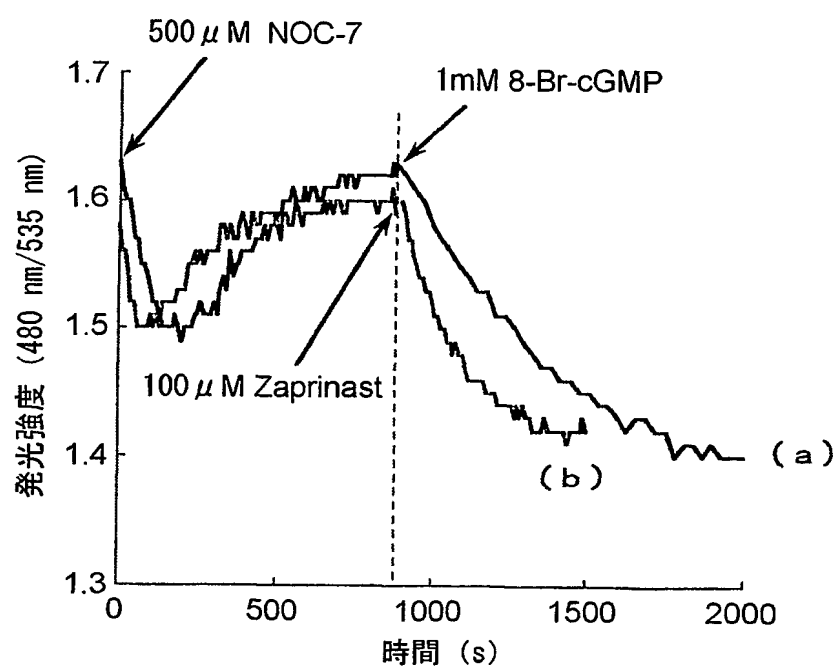


図 8



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Probe for imaging cGMP and method of detecting and determining cGMP

<130> NP00199-SH

<140> 2000-202730

<141> 2000-07-04

<160> 2

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 1

Met Asp Glu Leu Lys Tyr

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 2

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Asn

1

5

10



1

2

3

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2001

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2001 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2001

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Cas Online cyclic guanosine monophosphate, fluorescence, kinase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Norbert Wild et al., "Expression of a chimeric cGMP-sensitive regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase type I α ", FEBS Letters, 374, (1995), pages 356 to 362	1-9
A	Kazuhiko SEYA et al., "A Fluorometric Assay for Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Incorporating a Sep-Pak Cartridge and Enzymatic Cycling", Analytical Biochemistry, 272, (1999), pages 243 to 249	1-9
A	US 5998204 A (The Regents of the University of California), 07 December, 1999 (07.12.99), & WO 98/40477 A & AU 9867023 A & EP 970199 A	1-9
P,X	Moritoshi SATO et al., "Fluorescent Indicators for Cyclic GMP Based on Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase I α and Green Fluorescent Proteins", Analytical Chemistry, 15 December, 2000 (15.12.00), 72, (2000), pages 5918 to 5924	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 August, 2001 (15.08.01)Date of mailing of the international search report
28 August, 2001 (28.08.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05631

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	Akira HONDA et al., "Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator", PNAS, 27 February, 2001 (27.02.01), 98, (2001), pages 2437 to 2442	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/05631

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2001年
日本国登録実用新案公報	1994-2001年
日本国実用新案登録公報	1996-2001年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Cas Online cyclic guanosine monophosphate, fluorescence, kinase

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Norbert Wild et al., Expression of a chimeric cGMP-sensitive regulatory subunit of the cAMP-depedent protein kinase type I α , FEBS Letters, <u>374</u> (1995), p. 356-362	1-9
A	Kazuhiko Seya et al., A Fluorometric Assay for Cyclic Guanosine 3',5'-Monophosphate Incorporating a Sep-Pak Cartridge and Enzymatic Cycling, Analytical Biochemistry, <u>272</u> (1999), p. 243-249	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.08.01

国際調査報告の発送日

28.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	US 5998204 A(The Regents of the University of California), 7.12月.1999(07.12.99), & WO 98/40477 A & AU 9867023 A & EP 970199 A	1-9
P,X	Moritoshi Sato et al., Fluorescent Indicators for Cyclic GMP Based on Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase I α and Green Fluorescent Proteins, Analytical Chemistry, December 15, 2000 (15.12.00), <u>72</u> (2000), p.5918-5924	1-7
P,A	Akira Honda et al., Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator, PNAS, February 27, 2001 (27.02.01), <u>98</u> (2001), p.2437-2442	1-9